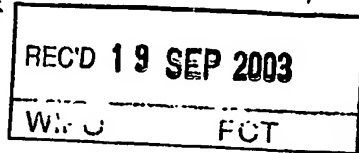


05.08.03

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 7月12日

出願番号  
Application Number: 特願2002-204887  
[ST. 10/C]: [JP2002-204887]

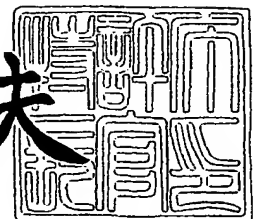
出願人  
Applicant(s): タカラバイオ株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月 4日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 T-1783

【提出日】 平成14年 7月12日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/87

【発明者】

    【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社  
社内

    【氏名】 曹 春渝

【発明者】

    【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社  
社内

    【氏名】 佐川 裕章

【発明者】

    【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社  
社内

    【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

    【識別番号】 302019245

    【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社

    【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 173212

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 標的核酸への変異の導入方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標的核酸の塩基配列に変異を導入する方法であって、

(1) 逆方向反復配列を有する DNA を調製する工程；ここで、当該逆方向反復配列を有する DNA の塩基配列は標的核酸に相同的で、かつ標的核酸に導入しようとする変異を含む塩基配列を有している、及び

(2) 前記逆方向反復配列を有する DNA を細胞内に導入する工程、を包含することを特徴とする標的核酸への変異の導入方法。

【請求項 2】 標的核酸が、細胞質に存在する核酸である請求項 1 記載の標的核酸への変異の導入方法。

【請求項 3】 標的核酸が、核に存在する核酸である請求項 1 記載の標的核酸への変異の導入方法。

【請求項 4】 逆方向反復配列を有する DNA が二本鎖 DNA である請求項 1 ～ 3 いずれか記載の標的核酸への変異の導入方法。

【請求項 5】 逆方向反復配列を有する DNA が一本鎖 DNA である請求項 1 ～ 3 いずれか記載の標的核酸への変異の導入方法。

【請求項 6】 同時に複数の変異を標的核酸に導入することを特徴とする請求項 1 ～ 5 いずれか記載の標的核酸への変異の導入方法。

【請求項 7】 標的核酸に導入される変異が、塩基の置換、欠失及び／又は挿入である請求項 1 ～ 6 いずれか記載の標的核酸への変異の導入方法。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 7 いずれか記載の方法により標的核酸に変異を導入するためのキットであって、標的核酸に相同的で、かつ標的核酸に導入しようとする変異を含む塩基配列を有している逆方向反復配列を有する DNA を含有することを特徴とするキット。

【請求項 9】 逆方向反復配列を有する DNA が二本鎖 DNA である請求項 8 記載のキット。

【請求項 10】 逆方向反復配列を有する DNA が一本鎖 DNA である請求項 9 記載のキット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【産業上の利用分野】**

本発明は遺伝子への変異導入、遺伝子上の変異修復に有用な、標的核酸への変異の導入方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

現在行われている遺伝子治療は、細胞中の遺伝子の欠損、変異によって機能に異常をきたした細胞に対して、ウイルスベクター等を用いてその遺伝子を細胞に導入する方法である。これによって、細胞が正常な機能を回復し本来の役割を果たすことができる。いわば遺伝子の補充療法である。

しかしウイルスベクターによる遺伝子の導入は問題点を有している。通常、遺伝子は染色体上にランダムに挿入されることから、その細胞に重要な別な遺伝子の中、あるいはその制御領域（プロモーター領域等）に挿入された場合には細胞の機能に悪影響が現れる可能性がある。また、染色体上には変異遺伝子があるまま残存しており、この変異遺伝子由来の変異タンパクが正常な遺伝子由来の正常タンパクと類似した構造をもつ場合、変異タンパクが正常タンパクの機能を妨げる可能性もある。

**【0003】**

近年、ウイルスベクターによるDNAの導入とは違って、細胞中の目的遺伝子の塩基を変換させる遺伝子ターゲティング法が注目されている。具体的な例を挙げれば、トーマス・ジェファーソン大学のEric B. Kmiecが開発したキメラ形成法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, p 2071~2076 (1996)] では、変化させたい塩基部分をDNAとし、その両端に位置決めのためのRNAを配したキメラオリゴヌクレオチドを用いている。DNA同士よりもRNAとDNAの方が強く結合するので、キメラオリゴヌクレオチドを細胞に導入すると両端のRNAの塩基配列が細胞内のDNAの中から対応する塩基配列をみつけて二本鎖を形成し、次いでミスマッチ修復によって目的部位に変異が導入される。しかし、キメラオリゴヌクレオ

チドの環状構造が複雑で、それを維持するため余計な8つのチミン (thymine) が使われているので、標的DNAへの結合力に対してかなりのマイナス面がある。

最近、同じグループのO. Igouchevaらが一本鎖オリゴヌクレオチド (single stranded oligonucleotides) 形成法 [Gene Therapy, Vol. 8, p391~399 (2001)] を開発した。ここでは標的核酸中の変異させようとする塩基に対応する塩基を中央に配し、両側に細胞中のヌクレアーゼに分解されにくい数個のメチル化したウラシル (uracil) をつけた数十個塩基のオリゴヌクレオチドが使用されている。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記の二種類の変異導入方法はともに修復効率がまだ低い。二つの中では修復効率がよい一本鎖オリゴヌクレオチド (ssオリゴ) 形成法でも明確な欠点がある。それは標的核酸に結合した後のミスマッチ修復の過程で、二本鎖DNAのセンス、アンチセンス両鎖の変異塩基を一度に修復することができず、どちらか一方の変異塩基を修復するだけで、残りの相補鎖中の変異塩基を細胞のミスマッチ修復機構によってもう一回修復する必要がある。

前記Kumiecらのキメラオリゴヌクレオチド (キメラオリゴ) は環状構造の維持とヌクレアーゼによる分解からの保護のため、標的DNAと関係のない配列が導入されている。その数はオリゴ全体の一割強を占めている。このため、キメラオリゴの標的DNAへのターゲッティング活性が低い。

#### 【0005】

もう一つ大事なポイントは、キメラオリゴとssオリゴにおける修復のメカニズム、使用されるオリゴヌクレオチドの構造から見たとき、離れている二つ以上の塩基の同時修復が不可能ということである。もし、二つ以上の離れている変異塩基の修復あるいは変異の導入を行う場合は、数回のオリゴヌクレオチド導入とクローニングを行なわなければならない。手間がかかることは勿論、現在の細胞へのDNA導入技術では細胞へのダメージが大きく、生存し、かつ所望の機能を

保持した細胞を得ることは困難である。

#### 【0006】

遺伝子治療の発展と共に、上記のようにメカニズムが複雑で、かつ効果の悪い修復方法にかわる、複数の塩基を同時に修復することが可能で、かつ効果の高い方法が求められている。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意検討した結果、逆方向反復を有するDNAを使用することにより、標的核酸中の塩基に効率よく変異を導入することができることを見出し、本発明を完成させた。

#### 【0008】

本発明の第1の発明は、標的核酸の塩基配列に変異を導入する方法に関し、

(1) 逆方向反復配列を有するDNAを調製する工程；ここで、当該逆方向反復配列を有するDNAの塩基配列は標的核酸に相同的で、かつ標的核酸に導入しようとする変異を含む塩基配列を有している、及び

(2) 前記逆方向反復配列を有するDNAを細胞内に導入する工程、を包含することを特徴とする。

#### 【0009】

第1の発明において、標的核酸は細胞質、または核に存在する核酸であることができる。また、逆方向反復配列を有するDNAは二本鎖、一本鎖いずれのDNAでもよい。

#### 【0010】

第1の発明の方法によれば、同時に複数の変異を標的核酸に導入することも可能である。標的核酸に導入される変異としては塩基の置換、欠失及び／又は挿入が例示される。

#### 【0011】

本発明の第2の発明は、第1の方法により標的核酸に変異を導入するためのキットであって、標的核酸に相同的で、かつ標的核酸に導入しようとする変異を含む塩基配列を有している逆方向反復配列を有するDNAを含有することを特徴と

する。

#### 【0012】

第2の発明のキットに含有される逆方向反復配列を有するDNAは二本鎖、一本鎖DNAのいずれでもよい。

#### 【0013】

##### 【発明の実施の形態】

本明細書に記載の「標的核酸」には特に限定はなく、変異の導入が望まれる核酸のいずれもが包含される。例えば、本発明は細胞内に存在するDNAへの変異の導入に使用することができ、細胞質に存在するDNA（エピゾームDNA；プラスミド、ミトコンドリアDNA等）、核内に存在するDNA（染色体DNA）を標的核酸とすることができる。

また、本発明で標的核酸に導入される変異にも特に限定はなく、塩基置換の他、欠失、挿入等の変異を導入することも可能であり、この場合には、使用する逆方向反復配列を有するDNAに上記の変異を有する塩基配列を包含させればよい。

さらに、本発明における変異の導入が、正常な塩基配列への変異の導入のみならず、天然において生じた塩基配列の変異を正常な配列に修復する態様を包含することは当然である。

#### 【0014】

本発明に使用される逆方向反復配列を有するDNA（以下、逆方向反復DNAと記載することがある）は、標的核酸に相同的で、かつ標的核酸に導入しようとする変異を含む塩基配列を有しているDNAである。ここで「相同的」とは、標的核酸もしくはその相補鎖との間で二本鎖を形成しうる塩基配列を有することを指し、完全に一致した塩基配列を有することを意味するものではない。すなわち、塩基対の形成によって標的核酸との間に二本鎖を形成するに十分な塩基配列を有していることを意味する。

逆方向反復配列を有するDNAの作製方法には特に限定はなく、化学的な合成、酵素的な合成（核酸増幅反応等）、生物学的な合成（プラスミド等の自己複製能を有する核酸を利用する方法）のいずれもが使用できる。逆方向反復を有する

DNAは標的核酸のセンス鎖、アンチセンス鎖の配列がタンデムに並んだものであるが、両者の間には標的核酸への変異導入が可能な範囲で、任意の配列（スペーサー）が挿入されていてもよい。

#### 【0015】

本発明には、逆方向反復を有する二本鎖DNAを使用することができるが、このような二本鎖DNAを変性して得られる一本鎖DNAを使用することもできる。当該一本鎖DNAはセンス鎖部分とアンチセンス鎖部分が互いに相補的な塩基配列を有しているために、両部分が塩基対結合を形成したヘアピン構造をとることもあるが、本発明ではこのような形態の一本鎖DNAも使用することができる。

上記のヘアピン構造を形成した逆方向反復配列を有するDNAは、米国特許第5,643,762号、第5,714,323号、第6,043,028号にs1 DNAとして記載された一本鎖DNAと同じ方法により調製することができる。

#### 【0016】

本発明の方法では標的核酸上の2箇所以上に同時に変異を導入することも可能である。このような目的に使用される逆方向反復配列を有するDNAはできるだけ長い方がいいと考えられる。細胞の増殖周期の中のDNA合成期（S phase）において、DNA相同組換え修復が行われる。親DNAから娘DNAへの複製の際、親DNAらせんが解けて複製フォークが形成される。この時期にフォーク部分のDNAのセンス鎖とアンチセンス鎖の両方に同時に結合できるDNAが、ターゲティング活性が高いはずである。以上のことから、本発明者らは、一本鎖のDNAで、標的DNAのセンス鎖とアンチセンス鎖の配列を持つ、つまり、標的DNAのセンス、アンチセンス両鎖に結合できる一本鎖の逆方向反復DNAを作製した。

#### 【0017】

方法としては、まず、プラスミドに二つの同じ遺伝子或いはその断片が向きを逆にして並んだ逆方向反復DNAインサートが入っているプラスミドを構築する。例えば、実施例2のようなプラスミドの構築方法である。このプラスミドでト



ランスフォームした大腸菌を培養して大量のプラスミドを得ることができる。プラスミド中の逆方向反復DNAインサートの両端にある制限酵素を使いインサートをベクターから切断すると逆方向反復DNAを得ることができる。また、上記のプラスミドを鋳型としたPCR法で逆方向反復DNAを増幅する方法もある。

ただ、上記のプラスミドの構築において、逆方向反復DNAに挿入される遺伝子あるいはその断片は、特に限定するものではないが、一般的に500bpから1500bpまでが好ましい。500bp以下の場合には、全く同じ二つのDNA断片を互いに逆方向でベクタープラスミドに挿入することは難しいことがある。このような場合には他の方法、例えば化学的、もしくは酵素的に目的のDNAを合成することもできる

また、相同組換えを起こしやすいように、変異を導入しようとする標的核酸上の部位の上、下流の数十から百数十塩基を含む塩基配列を有する逆方向反復DNAが本発明には好ましい。

#### 【0018】

本発明により、逆方向反復配列を有するDNAを使用して標的核酸中に変異を導入する場合、例えば、遺伝子上に存在する変異塩基を是正する場合は、変異塩基に対応する部位に正常な塩基を含むワイルドタイプ（野生型）遺伝子の配列を持つ逆方向反復DNAを作製し、公知のDNA導入法、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、脂質を媒体としたトランスフェクション法などを用いて細胞に導入すると変異塩基の修復ができる。

逆に、ワイルドタイプ遺伝子に変異を導入する場合はその遺伝子に導入したい塩基（塩基配列）を含ませた逆方向反復DNAを調製し、上記のDNA導入法を用いて細胞に導入すれば、標的遺伝子に変異導入ができる。

#### 【0019】

本発明の方法により遺伝子のノックアウトを行うこともでき、この場合には、例えば、開始コドンであるATG中の一つまたは二つの塩基を置換してタンパクへの翻訳を妨害すればよい。また、標的遺伝子の塩基配列に一つまたは二つの塩基を挿入した（もしくは欠失させた）逆方向反復DNAを調製し、これを利用して標的遺伝子のタンパクをコードする領域の塩基配列にフレームシフトを生じさ

せて遺伝子のノックアウトを達成することができる。例えば、遺伝子の開始コドン塩基、開始コドンから2～30塩基以内、酵素タンパクの場合はその酵素活性部位に当たるアミノ酸残基をコードする塩基、蛍光を出すタンパクの場合はその蛍光を決めるアミノ酸残基をコードする塩基を変異させることが望ましい。

#### 【0020】

二つまたは二つ以上の離れた変異塩基を同時に修復することが可能であることが本発明の最も重要な特徴である。数百から千数百塩基の間に、標的核酸中の複数の変異塩基を修復できるような塩基を含有させた、数百から千数百塩基の逆方向反復DNAを使用すれば、単一の変異塩基の修復と同様に複数の変異を修復することができる。例えば、実施例5のように遺伝子中の約200塩基離れた二つの変異塩基を一度で直すことが可能である。

上記の態様により、2以上の部位に変異を導入する場合の、前記部位間の距離には特に限定はなく、数百塩基離れていてもよい。変異導入効率の観点からは、好ましくは200塩基以内の部位であり、より好ましくは100塩基以内であり、特に好ましくは30塩基以内である。

#### 【0021】

本発明は、上記の本発明の変異の導入に使用されるキットを提供する。1つの実施態様において、該キットは標的核酸に変異を導入するための逆方向反復配列を有するDNAを含有する。さらに、前記DNAを細胞に導入するための試薬を含有するものであってもよい。

#### 【0022】

##### 【実施例】

以下に実施例をもって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例の範囲に何ら限定されるものではない。

#### 【0023】

##### 実施例1

Red-shift Green Fluorescent Protein 遺伝子への変異塩基の導入

プラスミド pQBI25 (タカラバイオ社製) に挿入されている Red-sh

if t Green Fluorescent Protein (以下GFPと略称する) をコードする遺伝子(配列表の配列番号1) について、該遺伝子が発現されることがないように、その塩基配列中の一つの塩基を置換した。PCR in vitro mutagenesis kit (タカラバイオ社製) を使用し、GFPの蛍光に重要な66~68番目アミノ酸残基のうち、67番目のチロシンをコードするコドンTATを終止コドンであるTAGに変えた。このようにして作製した変異GFP (mGFP) 遺伝子と変異を導入しないGFPをコードする遺伝子をそれぞれプラスミドpDON-AI (タカラバイオ社製) に挿入し、pDON-mGFPとpDON-GFPを構築した。これらのプラスミド1  $\mu$ gを含むTE緩衝液50  $\mu$ lずつを、1  $\mu$ gのlipofectamine 2000 (LF2000, Gibco BRL社製) を含む50  $\mu$ lのOpti men培地 (Gibco BRL社製) と混ぜて293細胞にトランスフェクトし、4日後に蛍光顕微鏡で観察した。pDON-GFPを加えた細胞では強い緑蛍光が観察されたが、pDON-mGFPが入った細胞には蛍光がみられなかった。この結果、細胞内で蛍光を発することのない、変異遺伝子が構築された。このmGFP遺伝子を以降の実験に用いた。

#### 【0024】

##### 実施例2

GFP遺伝子の塩基配列を有する逆方向反復DNA (以下irDNAと称す) を作るために、先ず、プラスミドにirDNA増幅の鋳型となる逆向きの二つのGFP遺伝子断片を組み込んだ。プラスミドpQBI25 (タカラバイオ社製) に挿入されているGFP遺伝子の全配列をプライマーUs-EcoRI、DEND (配列表の配列番号2、3) で増幅した断片をEcoRI、BamHI (ともにタカラバイオ社製) で消化して得られた762bpのDNA断片をプラスミドpUC19 (タカラバイオ社製) のEcoRI、BamHIサイト間に組み込んだ。ついで、このプラスミドのHindIII、BamHIサイト間にGFP遺伝子の全配列をプライマーUs-hindIII (配列表の配列番号4) およびDENDを用いて増幅して得られたDNA断片を、HindIII (タカラバイオ社製) およびBamHIで消化して得られた762bpのDNA断片を組み込

んだ。こうして構築されたプラスミドを p u c G F P 0-0 と命名した。

また、G F P 遺伝子の全配列をプライマー U s - E c o R I および D E N D を用いて増幅した断片を E c o R I、P v u I I (タカラバイオ社製) で消化して得られた 712 b p の DNA 断片をプラスミド p U C 19 の E c o R I、S m a I サイト間に組み込んだ。次いで、このプラスミドの H i n d I I I、B a m H I サイト間に G F P 遺伝子の全配列をプライマー U s - h i n d I I I および D E N D を用いて増幅して得られた DNA 断片を H i n d I I I、B a m H I で消化して得られた 762 b p の DNA 断片を組み込んだ。こうして構築されたプラスミドを p u c G F P 0-2 と命名した。

さらに、G F P 遺伝子をプライマー U 100 h i n d I I I および U 100 b a m h I (配列表の配列番号 5、6) で増幅して得られた DNA 断片を H i n d I I I、B a m H I で消化して 112 b p の DNA 断片を調製した。上記のプラスミド p u c G F P 0-0 中の 762 b p の H i n d I I I - B a m H I 断片をこの 112 b p の DNA 断片と置き換え、プラスミド p u c G F P 0-6 を構築した。

#### 【0025】

p u c G F P 0-0 は G F P をコードする遺伝子の全長について逆方向反復配列を有しており、インサート DNA の長さは 1518 b p である。p u c G F P 0-2 は反復配列の一方が終止コドンから 38 塩基までを欠失しており、インサート DNA の長さは 1479 b p である。プラスミド p u c G F P 0-6 は G F P をコードする遺伝子の全長と G F P 遺伝子中の 150 ~ 250 番目の塩基から形成される逆方向反復配列を有しており、インサート DNA の長さは 868 b p である。図 1 A に p u c G F P 0-0、図 1 B に p u c G F P 0-2、図 1 C に p u c G F P 0-6 を図示する。

#### 【0026】

p u c G F P 0-0、p u c G F P 0-2、p u c G F P 0-6 をそれぞれ鋳型とした P C R により、逆方向反復 DNA である 0-0 i r D N A、0-2 i r D N A、0-6 i r D N A を作製した。0-0 i r D N A、0-2 i r D N A の作製にはプライマー U s - e c o R I -1、U s - h i n d I I I -

1 (配列表の配列番号7、8)、また0-6 i r DNAの作製にはプライマー U s - e c o R I - 1、U 1 0 0 h i n d I I I - 1 (配列表の配列番号9) を使用した。m G F P 遺伝子に導入された変異塩基であるGとCを、野生型G F P 遺伝子の塩基に取り戻すためのTとAは、0-0 i r DNA、0-2 i r DNA、0-6 i r DNA におけるセンス鎖の5' 側或いはアンチセンス鎖の3' 側 (E c o R I s i t e) からそれぞれ237と1282、237と1243、237と813番目の塩基に当たる。図1において、m G F P 遺伝子のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖における、変異塩基の修復に関与する塩基の位置を\*および#で示している。

### 【0027】

#### 実施例3

エピゾーム (e p i s o m e) 実験モデルでのm G F P 遺伝子の単一変異塩基の修復

逆方向反復DNAによる遺伝子修復実験を行い、標的核酸との結合、標的核酸の変異塩基の修復を調べた。数回のDNA導入による細胞への毒性の影響を避けて、標的核酸であるm G F P 遺伝子を組み込んだプラスミド (p c e p - m G F P) と、修復用の三種類の逆方向反復DNA (i r DNA) またはコントロールに用いたs s オリゴのいずれかを同時に細胞質に導入した。s s オリゴの塩基配列を配列表の配列番号10に示す。

### 【0028】

#### (1) 熱で変性したi r DNAによるエピゾームm G F P 遺伝子の修復

実験モデルを作るために、実施例1で構築したp D O N - m G F P からm G F P 遺伝子を含む762bpのH i n d I I I - B a m H I 断片を単離し、e p i s o m a l m a m m a l i a n 発現ベクターであるp C E P 4 (I n v i t r o g e n 社製) のH i n d I I I、B a m H I サイトの間にサブクローニングし、プラスミドp c e p - m G F Pを作った。48ウェルプレートに293細胞 (8万個) を播いて、10% F B Sを含むD E M E 培地で一晚培養した。それぞれ2  $\mu$  gの0-0 i r DNA、0-2 i r DNA、0-6 i r DNAをそれぞれ94℃、5分間で熱変性し、氷水で急冷した。2  $\mu$  gのs s オリゴ、0-

0 i r DNA、0-2 i r DNA、0-6 i r DNAと1.5  $\mu$ gのp c e p-mGFPを37.5  $\mu$ lのOpti men培地で希釈し、同量の2  $\mu$ gのLF2000を含むOpti men培地と混ぜた。3.5  $\mu$ gのp c e p-mGFPだけを含む37.5  $\mu$ lのOpti men培地と、同量の2  $\mu$ gのLF2000を含むOpti men培地と混ぜた混合物をネガティブコントロールとした。

20分間のインキュベーション後、これらのDNA-LF2000 r e a g e n t c o m p l e x e sを細胞に添加して、30分間室温に置き、更に150  $\mu$ lのOpti men培地を加えた。6時間トランスフェクション後、1  $\mu$ lの10%FBSを含むDEME培地を添加した。48時間後、mGFP遺伝子上の変異塩基が修復されて緑蛍光を発する細胞（GFP陽性細胞）が見られるようになり、4日目にGFP陽性細胞が一番多くなった。この細胞をトリプシンで処理してプレートから細胞を外し、FACSでGFP陽性細胞を測定した。その結果を表1に示す。

mGFP遺伝子上の変異塩基の修復の指標である239細胞1万細胞あたりのGFP陽性細胞の数は0-0 i r DNAの場合が最も多く、その修復効果はs sオリゴによるものの約3倍であった。

### 【0029】

【表1】

表1

DNA	10 <sup>4</sup> 細胞あたりのGFP陽性細胞数
0-0 i r DNA	18.21 $\pm$ 4.22個
0-2 i r DNA	11.79 $\pm$ 2.84個
0-6 i r DNA	5.26 $\pm$ 0.74個
s sオリゴ	5.40 $\pm$ 2.64個

### 【0030】

(2) 熱変性しないi r DNAによるエピゾームmGFP遺伝子の修復

PCR増幅により調製したi r DNAを熱変性することなく使用した他は、上

記実施例 3-(1)と同じ操作で mGFP 遺伝子の修復を調べた。1 万個の 293 細胞中に出現した GFP 陽性細胞の数を表 2 に示す。熱変性しない i rDNA を使用した場合の修復効率はいずれも s s オリゴより高かった。

#### 【0031】

【表 2】

表 2

DNA	10 <sup>4</sup> 細胞あたりの GFP 陽性細胞数
0-0 i rDNA	39.27±9.21 個
0-2 i rDNA	20.78±2.80 個
0-6 i rDNA	13.12±2.15 個
s s オリゴ	6.54±2.64 個

#### 【0032】

一方、標的核酸である pcep-mGFP と変異修復用 0-0 i rDNA を 6 時間の間隔をあけて順次トランスフェクションした場合も、s s オリゴを使用した場合より高い修復効率を得られた。

#### 【0033】

上記(2)の実験において、標的核酸であるプラスミドは使用した細胞のすべてに導入されていないことが明らかとなったことから、pcep-GFP と 0-0 i rDNA とを上記と同一の条件で 293 細胞に導入し、GFP 陽性細胞数を調べた。この結果、21.22±4.67% の細胞だけにプラスミドが入っていた。従って、表 2 に示された結果をプラスミドが入ってない細胞を除いて換算すると、pcep-mGFP が導入されている細胞 1 万個当たりの、変異塩基が修復された GFP 陽性細胞の数は表 3 のとおりとなった。

#### 【0034】

【表 3】

表 3

DNA	pcep-mGFPが導入されている細胞 10 <sup>4</sup> 個あたりのGFP陽性細胞数
0-0 irDNA	201.42±58.42個
0-2 irDNA	109.12±27.48個
0-6 irDNA	72.24±23.97個
ssオリゴ	39.76±20.94個

## 【0035】

上記の実験においてトランスフェクションには三種類のirDNAとssオリゴをいずれも2 $\mu$ gずつ使用したが、それぞれをモル数に換算すると、ssオリゴのモル数が529nmol、0-0 irDNA、0-2 irDNA、0-6 irDNAのモル数がそれぞれ9.5、10.1、16.6nmolである。それでも、三つのirDNAがいずれもssオリゴより変異塩基の修復率が高かった。irDNAを熱で変性してトランスフェクションした場合でも、変性しないでトランスフェクションした場合でも、修復効率が高いのは全GFP遺伝子領域を含む0-0 irDNAであり、ssオリゴの5倍以上であった。0-0 irDNAの数がssオリゴより数十倍少ないにもかかわらず、修復効率がssオリゴより数倍高いという実験結果からは、irDNAの標的核酸へのターゲティング活性がssオリゴよりかなり高く、修復効率の向上を導いたと示唆された。

## 【0036】

## 実施例 4

## 染色体へのmGFP遺伝子の導入とその修復

Retrovirus packaging kit amphi (タカラバイオ社製)を用いて、細胞の染色体にmGFP遺伝子を導入するレトロウイルス粒子の作製を行なった。実施例1に記載の組み換えレトロウイルスベクターpDON-mGFPと上記キットのパッケージングベクターを、ともにリン酸カルシ



ウム法により同時に293細胞に導入した。48時間培養後、培養液上清を採取してフィルター濾過した。さらに、この培養液上清（レトロウイルス溶液）を希釈して293細胞の培地に添加した。ここからクローニングした細胞（293-10細胞）にmGFP遺伝子が入っていることはPCRで増幅したDNA断片のシーケンスを解析して確認した。

24ウェルプレートに293-10細胞（13万個）を播いて、10% FBSを含むDEME培地で一晚培養した。それぞれ3  $\mu$ gのssオリゴと0-0 irDNAをそれぞれOpti men培地で75  $\mu$ lになるように希釈し、3  $\mu$ gのLF2000を含む同量のOpti men培地と混ぜた。20分間インキュベート後、このDNA-LF2000 reagent complexesを細胞に直接にかけて、更に、90  $\mu$ lの10%FBSを含むDEME培地を添加してトランスフェクションを行った。培地中のssオリゴのモル数は744.00 nmolで、0-0 irDNAのは13.37 nmolであった。6時間後、1.5  $\mu$ lの10%FBSを含むDEME培地を添加した。さらに16~18時間後に10%FBSを含むDEMEに培地を交換した。

DNAの細胞核への導入率が低いため、遺伝子の修復効率も実施例3のepisomal遺伝子のものより低い。従って修復効率の定量は蛍光顕微鏡の下で、トランスフェクション後四日目の1ウェル毎（24ウェルプレート、200~300万細胞）のGFP陽性細胞を数えた。その結果を表4に示す。

#### 【0037】

【表4】

表4

DNA	1ウェルあたりのGFP陽性細胞数
0-0 irDNA	83.75 $\pm$ 24.87個
ssオリゴ	39.25 $\pm$ 9.63個

#### 【0038】

leporfectamineを用いて細胞質に導入したssオリゴと0-0 irDNAは、受動拡散の形で、濃度勾配に沿って核へ自由拡散する。0-0

i r DNAの濃度は s s オリゴの数十分の一であるため核に入るコピー数が少なく、0-0 i r DNAによる変異塩基の修復率は s s オリゴより低いと思われたが、実際の結果は s s オリゴより高い修復率を示した。この結果は、0-0 i r DNAが細胞核に入るコピー数が少なくても、高いターゲッティング活性を持つために、変異塩基の修復率が高いことを示唆した。

### 【0039】

#### 実施例 5

ダブルミューテーション GFP 遺伝子の修復。

PCR *in vitro* mutagenesis 法を適用し、GFP 遺伝子の開始コドンである ATG 中の G を T に変えた。このミューテーション GFP (m1 GFP) 遺伝子を pCEP4 にサブクロニングし 293 細胞にトランスフェクトして、蛍光が見られないことを確認した。さらに、この m1 GFP 遺伝子の HindIII-NheI 断片 (-36-174) を用い、既に実施例 1 で作製した mGFP 遺伝子上流側の HindIII-NheI 断片 (-36-174) と入れ替えて、ダブルミューテーション GFP (dmGFP) 遺伝子を構築した。

この dmGFP 遺伝子には二つの変異塩基があり、3 番目の T と 201 番目の G は 198 塩基離れている。この dmGFP 遺伝子に入っている 762 bp HindIII-BamHI 断片を、pCEP4 の HindIII と BamHI の間にサブクロニングし、標的核酸として使用するプラスミド pcep-dmGFP を作った。

実験条件は実施例 3 と同じ条件で、0-0 i r DNA によるダブルミューテーションの同時修復の効率を調べた。その結果、二つ変異塩基が一度に修復できたことを示す GFP 陽性細胞は、1 万細胞あたりに 13~15 個が得られた。

### 【0040】

#### 【発明の効果】

本発明により、高い効率で遺伝子上の塩基配列に変異を導入できる方法が提供される。本発明によれば、細胞内の DNA への人工的な変異の導入、あるいは変異が起こって機能していない遺伝子の修復を行うことができる。本発明の方法は

遺伝子治療、ノックアウト生物の作製、遺伝子機能の解析などに有用である。

【0041】

FREE TEXT

SEQ ID NO:1; Gene encoding red-shifted green fluorescence protein  
SEQ ID NO:2; PCR primer Us-EcoRI to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein  
SEQ ID NO:3; PCR primer DEND to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein  
SEQ ID NO:4; PCR primer Us-HindIII to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein  
SEQ ID NO:5; PCR primer U100HindIII to amplify a portion of gene encoding red-shifted green fluorescence protein  
SEQ ID NO:6; PCR primer D100BamHI to amplify a portion of gene encoding red-shifted green fluorescence protein  
SEQ ID NO:7; PCR primer Us-EcoRI-1 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein  
SEQ ID NO:8; PCR primer Us-HindIII-1 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein  
SEQ ID NO:9; PCR primer U100HindIII-1 to amplify a portion of gene encoding red-shifted green fluorescence protein  
SEQ ID NO:10; Chimeric oligonucleotide ss Oligo. "nucleotides 1 to 4 and 50 to 53 are 2'-O-methyluridine"

【0042】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Method for introducing mutation into target nucleic acid

<130> T-1783

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Gene encoding  
red-shifted green fluorescence protein

<400> 1

atggctagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat 60  
ggtgatgta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaaggtga tgcaacatac 120  
ggaaaactta ccctgaagtt catctgcact actggcaaac tgcctgttcc atggccaaca 180  
ctagtcacta ctctgtgcta tgggtgttcaa tgcttttcaa gatacccgga tcatatgaaa 240  
cggcatgact ttttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc 300  
ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt 360  
gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggaaacat tctgggacac 420  
aaattggaat acaactataa ctacacaaat gtatacatca tggcagacaa acaaaagaat 480  
ggaatcaaag tgaacttcaa gacccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca 540

gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat 600  
tacctgtcca cacaatctgc ctttcgaaa gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc 660  
cttcttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaactga 720

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
Us-EcoRI to amplify a gene encoding red-shifted  
green fluorescence protein

<400> 2

cttgaattcg gtaccgagct cggatcgggc gcgcaagaaa

40

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
DEND to amplify a gene encoding red-shifted  
green fluorescence protein

&lt;400&gt; 3

cactggcggc cgttactagt

20

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
Us-HindIII to amplify a gene encoding  
red-shifted green fluorescence protein

&lt;400&gt; 4

cttaagcttg gtaccgagct cggatcgggc gcgcaagaaa

40

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
U100HindIII to amplify a portion of gene encoding  
red-shifted green fluorescence protein

&lt;400&gt; 5

ctaagcttct ggcaaactgc ctgttccatg gccaacacta

40

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
D100BamHI to amplify a portion of gene encoding  
red-shifted green fluorescence protein

&lt;400&gt; 6

tcggatccaa gtcatgccgt ttcatatgat ccgggtatct

40

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
Us-EcoRI-1 to amplify a gene encoding red-shifted  
green fluorescence protein

&lt;400&gt; 7

gaattcggta ccgagctcgg atcgggcgcg caagaaa

37

<210> 8

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
Us-HindIII-1 to amplify a gene encoding  
red-shifted green fluorescence protein

<400> 8

aagcttggtta ccgagctcgg atcgggcgcg caagaaa

37

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
U100HindIII-1 to amplify a portion of gene  
encoding red-shifted green fluorescence protein

<400> 9

aagcttctgg caaactgcct gttccatggc caacacta

38



<210> 10

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(4)

<223> um

<220> <221> modified\_base

<222> (50)..(53)

<223> um

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Chimeric  
oligonucleotide ss Oligo

<400> 10

uuuuatcttg aaaagcattg aacaccatag cacagagtag tgactagtgu uuut 54

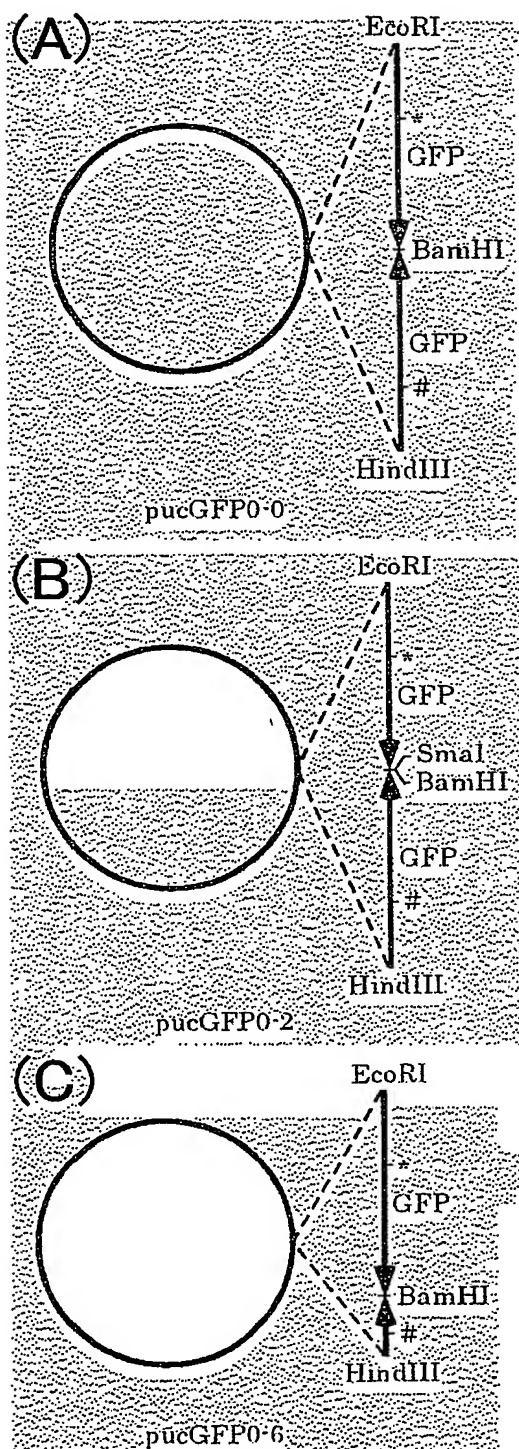
【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明において作製した、逆方向反復配列を有するプラスミドの  
模式図である。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【課題】 標的核酸に簡便、かつ高効率で目的とする変異を導入する手段を提供すること。

【解決手段】 下記の工程からなる変異導入方法により、標的核酸に目的の変異を導入する。

(1) 逆方向反復配列を有するDNAを調製する工程；ここで、当該逆方向反復配列を有するDNAの塩基配列は標的核酸に相同的で、かつ標的核酸に導入しようとする変異を含む塩基配列を有している、及び

(2) 前記逆方向反復配列を有するDNAを細胞内に導入する工程。

特願 2002-204887

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[302019245]

1. 変更年月日

2002年 4月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号

氏 名

タカラバイオ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**